

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

Доменюк В. П., асп., Вербицька Т. Г., канд. біол. наук, пров. наук. співр.,
Сиволап Ю. М., д-р біол. наук, академік УААН, директор
Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ RAPD-АНАЛІЗУ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК У ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ

Проведений RAPD-аналіз для виявлення поліморфних послідовностей ДНК генотипів вихідних форм сегрегуючої популяції кукурудзи (ГК 26 r Mo17). Пропонується поліпшена методика електрофоретичного аналізу продуктів довільно праймованої ПЛР у поліакриламідному гелі (система RAPD-ПААГ) з оптимальним співвідношенням: час розбігу — якість виразності — вартість методики. Використання запропонованої системи дозволило встановити два типи успадкування поліморфних ампліконів генотипом гібриду — домінування і кодомінування. Виявлене успадкування алелів за кодомінантним типом передбачається використати для розрахунків зчеплення поліморфних фрагментів з ознаками продуктивності кукурудзи.

Ключові слова: RAPD-аналіз, поліморфізм ДНК, кодомінування, ПААГ.

Вступ

Обсяги маркерної селекції вимагають все більш насичених карт зчеплення. Методика RAPD-аналізу (random amplified polymorphic DNA), виявляючи високий рівень поліморфізму між інбредними лініями кукурудзи, забезпечує швидкий аналіз генотипів на ранніх етапах картування [1-5]. Вивчення характеру успадкування поліморфних ампліконів у сегрегуючій популяції дозволяє простежити їх зв'язок з цінними селекційними ознаками [6]. Детекція поліморфізму батьківських ліній є ключовим етапом у картуванні локусів кількісних ознак кукурудзи з метою дослідження можливих асоціацій молекулярних маркерів з цими ознаками та з перспективою прогнозування продуктивності генотипів кукурудзи на популяційному рівні [7-8].

Використання великої кількості праймерів відкриває додаткові шляхи для детального вивчення полігенних ознак, збільшуючи можливість виявлення поліморфних локусів, що, з рештою, дає можливість створити маркерну прогнозуючу систему. Метод ПЛР з довільними праймерами дозволяє оцінювати декілька локусів одночасно, що потребує високої електрофоретичної виразності. Розподіл ампліконів на агарозних гелях, що використовуються за традицією, у більшості випадків відбиває лише загальну картину "наявності" або "відсутності" продуктів ампліфікації. Об'єктивність аналізу суттєво підвищують електрофореграми поліакриламідних (далі — ПАА) гелів. Актуальність даної проблеми підтверджується недавніми методичними розробками [6-14]. Проте, у даних роботах, незважаючи на досягнуту якість виразності, методика вимагає значних витрат часу.

У нашому дослідженні зроблена спроба знайти оптимальне співвідношення: час

розбігу зразків — якість виразності гелів — вартість методики при використанні поліакриламідних гелів для аналізу продуктів ПЛР з довільними праймерами.

Матеріал та методи

Вихідний матеріал: лінія GK26, лінія Mo17, гібрид F₁ — надані відділом селекції кукурудзи Селекційно-генетичного інституту. Батьківські інбредні лінії GK26 і Mo17 належать різним гетерозисним групам — Iodent та Lancaster відповідно. ДНК виділяли з етиольованих паростків кукурудзи із застосуванням цетавлону [15]. Умови проведення ампліфікації оптимізовані для приладу MJ Research (PTC-200). Для полімеразної ланцюгової реакції використовували 10 та 20-членні поодинокі олігонуклеотидні послідовності ДНК. Реакційна суміш об'ємом 20 мл утримувала 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl (рН 8,4 при 25°C), 0,01% Tween-20, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ праймера, 200 мМ кожного dNTP, 20 нг геномної ДНК, 1 од. Taq-полімерази.

Для ампліфікації RAPD-локусів застосовували “м'який віджиг”. Температурний режим: початкова денатурація — 94°C — 1 хв., далі 92°C — 40 с.; віджиг — 39-42°C (перші 5 циклів), далі 47-52°C (в залежності від довжини праймера) — 1 хв. — 33 цикли; синтез — 72°C — 1 хв.; остання елонгація — 7 хв.

Візуалізацію продуктів ампліфікації здійснювали за такою схемою. Попередню оцінку провадили у 2% агарозному гелі на TBE буфері (50 мМ трис-H₃BO₃, 2 мМ EDTA, рН 8,0) — 4-5 годин при 50 V, забарвлювали бромистим етидієм (1 мг/мл). Фотографували гелі в ультрафіолетовому світлі з червоним світлофільтром на плівку “Мікрат-300”. Електрофорез у поліакриламідному гелі провадили на обладнанні для вертикальних гелів (Hoefel SE600). Склад геля: 6% акриламід, 1×TBE у відсутності денатуруючих агентів. Товщина гелю — 0,75 мм. Розгін провадили у трис-боратному буфері. Умови проведення форезу: 500 V протягом 25-30 хвилин при 65°C. Забарвлювали азотнокислим сріблом.

Документування отриманих електрофореграм здійснювали відеосистемою VDS. Молекулярну вагу поліморфних фрагментів ДНК розраховували за допомогою комп'ютерної програми “Image Master 1D Elite” згідно стандарту рUC Mix (Fermentas).

Результати та обговорення

Система RAPD-ПААГ

Проведено порівняння електрофореграм продуктів ампліфікації на агарозних та поліакриламідних гелях. На агарозних гелях виявилась не досить чітка поліморфна картина ампліфікації (рис. 1). У більшості випадків на агарозних гелях важко диференціювати неполіморфні продукти і алелі, що в гелі йдуть поряд з невеликим кроком — до 10 нуклеотидів. Крім того, у випадку агарози профілі ДНК слабкої інтенсивності не завжди відновлюються і тому не можуть бути надійними як маркери.

Відносно високий рівень детекції і відновлювальності поліморфізму спостерігався при проведенні розгону продуктів ампліфікації у поліакриламідних гелях. Рис. 2 демонструє переваги поліакриламідних гелів перед агарозними. Для одних і тих же зразків у акриламідному гелі виявляється значно більша кількість поліморфних смуг, ніж у

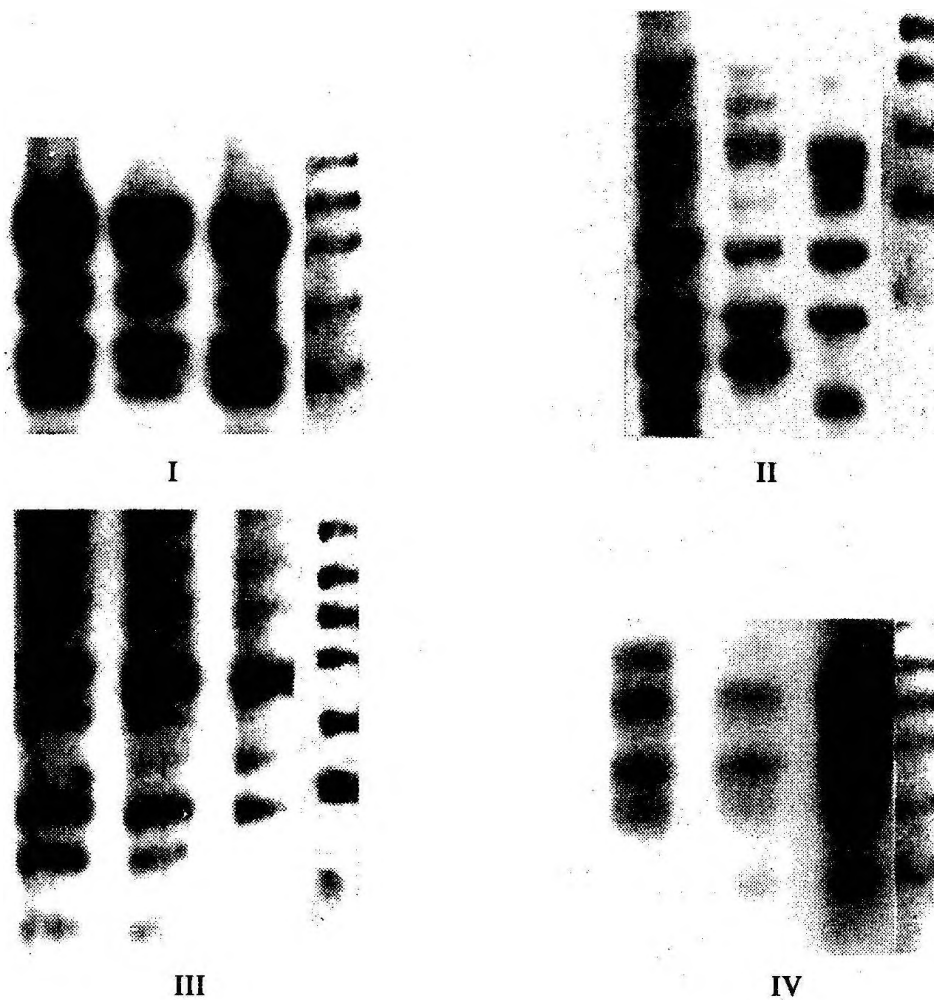


Рис. 1. Агарозні електрофореграми продуктів ПЛР з RAPD-праймерами: I — P53; II — P67; III — P75; IV — PD1; M — маркер молекулярної ваги — Ladder 100; P₁ — GK26, P₂ — Mo17.

агарозному. Можливо, що фрагменти ДНК близького розміру але різної послідовності краще розподіляються у поліакриламідному гелі та добре виявляються високо-чутливим забарвленням нітратом срібла. Розподіл продуктів ПЛР у ПАА гелях надав можливість спостерігати два типи успадкування поліморфних послідовностей ДНК:

1. Спостерігаються відмінності у швидкості руху фрагментів, що ампліфікуються у обох ліній. Гібрид успадковує ці алелі за кодомінантним типом (рис. 2). На агарозному гелі подібну ситуацію можна виявити тільки на ампліконах з великим кроком розбігу (більше 10 нуклеотидів). У цьому випадку можна говорити не про кодомінування, а про домінування у двох різних локусах.

2. Спостерігається відсутність смуги у одного із батьків (0 фенотип). На агарозних гелях це детектується тільки на інтенсивних ДНК-профілях. У поліакриламідному гелі можна виявити всі отримані продукти ампліфікації.

Зазначені висновки зроблені [6-14] шляхом застосування методу RAPD — DGGE-денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу. Відносна складність методики приготування градієнтного гелю — необхідність застосування денатуру

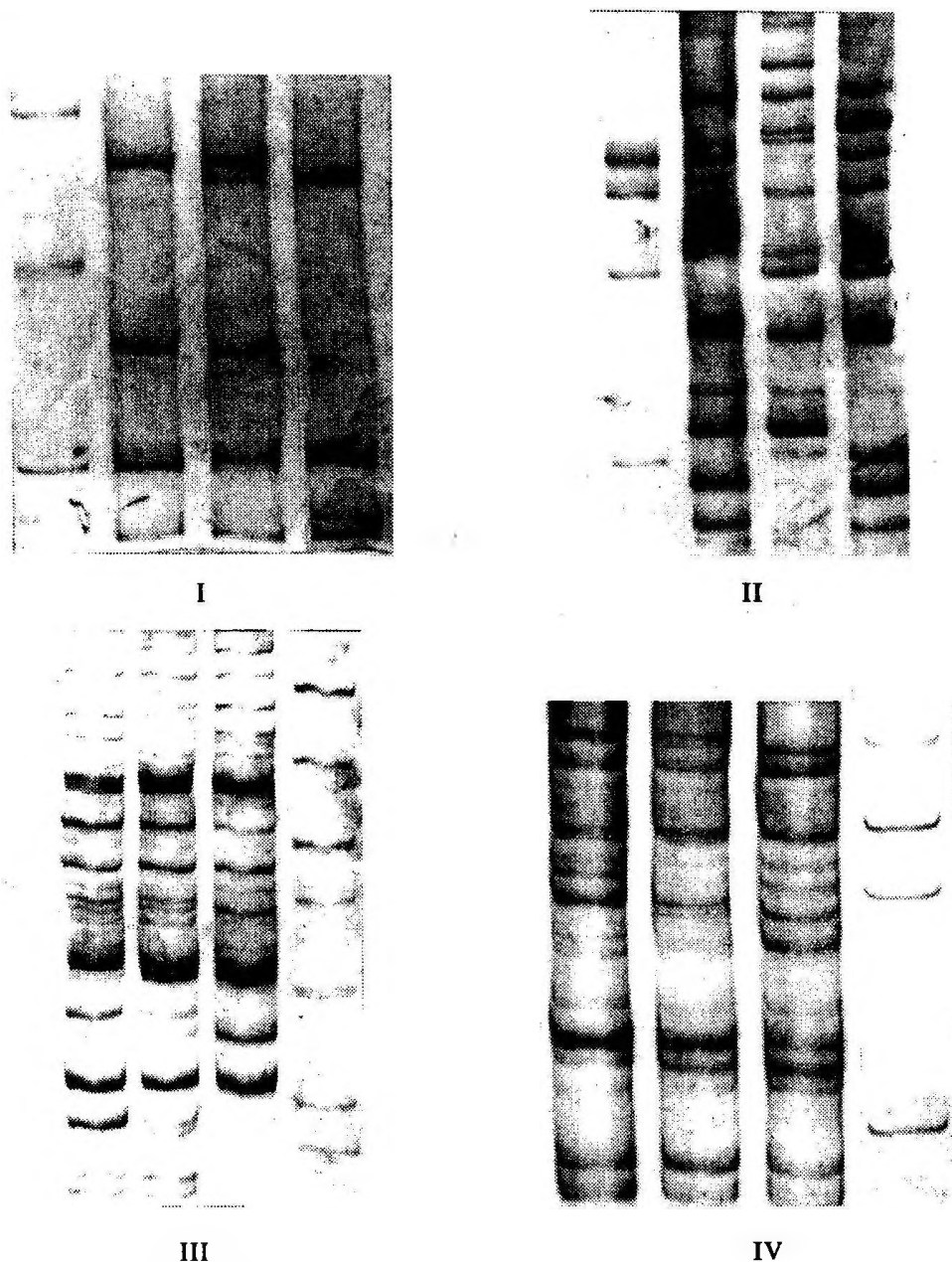


Рис. 2. Поліакриламідні електрофореграми продуктів ПЛР з RAPD-праймерами: I — P53; II — P67; III — P75; IV — PD1; M — маркер молекулярної ваги — pUC Mix; P₁ — ГК26, P₂ — Мо17. Стрілкою вказані поліморфні продукти, що успадковуються за кодомінантним типом.

ючих агентів (7 М сечовина, 40% формамід), тривалість розбігу (5 годин) — накладають обмеження на застосування цього методу у масовому експрес-аналізі.

Запропонована нами методика не потребує додаткового обладнання для створення градієнта і значно скорочує витрати часу. На розбіг продуктів ампліфікації витрачається 25-30 хвилин за рахунок низької концентрації акриламід (6%), температурних умов (65°C) та відсутності денатуруючих агентів.

Висока розрізняльна та розподільча здатність поліакриламідних гелів, яка

полегшує інтерпретацію типів успадкування поліморфних продуктів, дозволяє використовувати ці гелі для експрес — аналізу сегрегуючої популяції F₂.

Таблиця 1

Характеристика праймерів, детектуючих поліморфізм послідовностей ДНК у лінії кукурудзи ГК26 і Мо17

№	Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' — 3'	ГЦ-склад %	Умови віджигу °С	Тип виявленого поліморфізму*
1	P2	GACAGACAGACAGACA	50	53	1; 2
2	P3	GATTTAGGTGACACTATAG	36,8	53	1; 2
3	P5	AGGTCTTAACTTGACTAACAT	33,3	52	1
4	P20	TGGCCTGGCTGCCCTGAGCAG	71,4	52	1
5	P24	TGCTCTGCC	70	47	1; 2
6	P26	TACCTTCCCC	60	47	1
7	P27	TACCTTCCCG	60	47	1; 2
8	P29	GACCGCTTGT	60	47	1
9	P30	GCAGAGGAAGAG	58,3	47	1
10	P31	CCAAGAAGCGG	63,6	45	1
11	P32	TCGTCGATCGCG	66,6	47	1
12	P33	CGTCATGATC	50	47	1
13	P34	CAGCTGGGGA	70	47	1
14	P36	CCGAATTCGC	60	47	1
15	P37	CTGACCAGCC	70	47	1
16	P38	GATACGTTGTC	45,4	47	1; 2
17	P40	ACTCACTCGA	50	47	1
18	P41	ATAGGCGAGT	50	47	1; 2
19	P44	GGACCCCGCC	90	47	1
20	P46	GGTTGGGGAG	70	47	1; 2
21	P47	GGAGAGGGGG	80	47	1
22	P48	GCGGTGCTCG	80	47	1
23	P50	CCTGGAGTTG	60	47	1; 2
24	P53	GTCTAAGTCG	50	47	1; 2
25	P54	GTTAGCAGAC	50	47	1; 2
26	P55	GTTTCCTCG	50	47	1
27	P56	CGATTTGTCC	50	47	1
28	P57	TCAGGACGCTAC	58,3	47	1; 2
29	P59	CAAACCCAACGA	50	47	1
30	P61	GGACTGGGTCCG	75	47	1; 2
31	P63	CTGCCGCACTTGATACGTTGTC	54,5	52	1
32	P66	GTA AAAACGACGGCCAGT	52,9	52	1
34	P67	ATCCCTCTGGCATCGGCGTAA	57,1	52	1; 2
35	P75	CTGGAATATTCCTCG	50	47	1; 2
36	P76	CCCACAAAGAAAGCAATGG	47,4	52	1
37	P79	GCTCTACAAGGCCAATGG	55,5	52	1
38	P86	ATCCAGTTCTTGTGCACCTG	50	52	1
39	P93	CCACCAAGCGTGGAGTC	64,7	52	1; 2
40	PD1	GGCAGCAACATGGCATTC	55,5	53	1; 2

Примітка: *1 — домінування; 2 — кодомінування

Великий обсяг досліджень поліморфізму послідовностей ДНК потребує використання більш простих, дешевих та доступних методів. Аналіз продуктів ампліфікації у поліакриламідних гелях коштує принаймні в чотири рази дешевше аналізу з використанням агарозних гелів.

Швидкість аналізу, висока якість виразності гелів та відносна дешевизна методики дозволяють вважати застосування системи RAPD-ПААГ досить перспективним підходом у практиці наукових досліджень.

RAPD-аналіз зразків ДНК

За допомогою розробленої системи RAPD-ПААГ проведено порівняльний аналіз геномної ДНК батьківських інбредних ліній GK26 і Mo17 з використанням 70 поодиноких праймерів. Розміри праймерів варіювали від 10 до 25 п.о. Не виявили відмінностей між батьківськими лініями 14 праймерів, 56 вказали на наявність відповідного фрагмента у одного із батьків при відсутності його у іншого (домінування), 16 праймерів, крім того, показали наявність фрагментів у кожної батьківської лінії, але з різною молекулярною вагою, при цьому гібрид успадковує обидва цих алелі (кодомінування). Варіанти кодомінування складають біля 5% від загального поліморфного стану вивчених локусів. Відібрано 16 RAPD-праймерів, детектуючих гетерозиготний стан локусів гібридного генотипу. Для вияву зчеплення маркер-ознака у популяції, що розщеплюється, перевага віддається саме кодомінантному типу успадкування у зв'язку з більшою кількістю генотипових класів у F_2 (їх буде 9, тоді як у випадку домінування тільки 4). Варіантів нетипової поведінки алелів не виявлено, кожний поліморфний фрагмент простежується у генотипі гібриду незалежно від типу успадкування.

Проведений аналіз дозволив відібрати 40 RAPD-праймерів, що детектують поліморфізм локусів у батьківських ліній.

Критеріями добору праймерів була здатність до детекції та відновлювальності поліморфних продуктів полімеразної ланцюгової реакції, успадкування яких передбачається простежити у сегрегуючій популяції F_2 , що дозволить з'ясувати їх асоціативні зв'язки з господарськими ознаками.

Менделівський характер успадкування та високий рівень поліморфізму послідовностей ДНК свідчать про доцільність застосування запропонованого методичного підходу для побудови деталізованої генетичної карти і відкривають у перспективі можливість прогнозуючої оцінки популяцій кукурудзи у селекції генотипів на продуктивність.

Література

1. Williams J. G., Kublic A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — V. 18. — P. 6531-6535.
2. Martin G. B., Williams J. G., Tanksley S. D. Rapid identification of markers near a *Pseudomonas* resistance gene in tomato using random primers and near-isogenic line // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1991. — V. 80. — P. 2336-2340.
3. Michelmore R. W., Paran I., Kesseli R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1991. — V. 88. — P. 9828-9832.
4. Reiter R. S., Williams J., Feldman K., Rafalski J. A., Tingey S. V., Scolnik R. S. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1992. — V. 89. — P. 1477-1481.

5. Сиволап Ю. М. Геном рослин та його поліпшення. — К.: Урожай, 1994. — С. 163-166.
6. Lander E. S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M. J., Lincoln S. E., Newburg L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // *Genomics*. — 1987. — V. 1 — P. 174-181.
7. Вербицкая Т. Г., Сиволап Ю. М., Соколов В. М. Генетический полиморфизм линий кукурузы и его связь с продуктивностью // *Актуальные проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. Тезисы конференции*. — Москва, 1996. — С. 15.
8. Кожухова Н. Э., Вербицкая Т. Г., Сиволап Ю. М. Исследование внутривидового полиморфизма кукурузы с помощью молекулярных маркеров // *Актуальные проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. Тезисы конференции*. — Москва, 1996. — С. 40.
9. He S., Oht H., Mackenzie S. Detection of sequence polymorphism among wheat varieties // *Theor Appl Genet*. — 1992. — V. 82. — P. 573-578.
10. Riedel G. E., Swanberg S. L., Kuranda K. D., Marquette K., LaPan P., Bledsoe P., Kennedy A., Lin B. Y. Denaturing — gradient — gel electrophoresis identifies genomic DNA polymorphism with high frequency in maize // *Theor Appl Genet*. — 1990. — V. 80. — P. 1-10.
11. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Res*. — 1990. — V. 18. — P. 6531-6535.
12. Abrams E. S., Murdaugh S. E., Lerman L. S. Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC-clamp // *Genomics*. — 1990. — V. 7. — P. 463-475.
13. Fisher S. G., Lerman L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitution are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 1983. — V. 80. — P. 1579-1583.
14. Myers R. M., Maniatis T., Lerman L. S. Detection and localisation of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis // *Method Enzymol*. — 1987. — V. 155. — P. 501-527.
15. Burmeister M., diSibio G., Cox D. R., Myers R. M. Identification of polymorphisms by genomic denaturing-gradient-gel electrophoresis: application to the proximal region of human chromosome 21 // *Nucleic Acids Res*. — 1991. — V. 19. — P. 1475-1481.
16. Gray M., Charpentier A., Walsh K., Wu P., Bender W. Mapping point mutations in the *Drosophila rosi* locus using denaturing-gradient-gel blots // *Genetics*. — 1991. — V. 127. — P. 139-149.
17. Lessa E. P. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural population // *Mol. Biol Evol*. — 1992. — V. 9. — P. 323-330.
18. Kamalay I., Tepsant C., Rufener C. Isolation and analysis of genomic DNA from single seeds // *Crop Sci*. — 1989. — №5. — P. 1079-1084.

Доменюк В. П., Вербицкая Т. Г., Сиволап Ю. М.

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ RAPD-АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК У ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

Резюме

RAPD-праймеры были использованы для выявления полиморфных последовательностей ДНК у генотипов исходных форм сегрегирующей популяции кукурузы (ГК26×Мо17). Предлагается улучшенная методика электрофоретического анализа продуктов произвольно праймированной полимеразной цепной реакции в полиакриламидном геле (система RAPD-ПААГ) с оптимальным соотношением: время разгонки — качество разрешения — стоимость методики. Метод будет использован для экспресс-анализа популяции F₂.

Ключевые слова: RAPD-анализ, полиморфизм ДНК, кодоминирование, ПААГ.

Domenyuc V. P., Verbitskaja T. G., Sivolap Yu. M.
South Plant Biotechnology Center UAAS,
Ovidipolskaya Dor., 3, Odessa, 65036, Ukraine.

**OPTIMIZATION OF RAPD-ANALYSIS FOR DETECTION
OF POLIMORPHISM DNA SEQUENCE IN MAIZE LINES.**

Summary

RAPD-primers have been used for detection of polymorphic sequences DNA in parental genotypes forms of the segregant maize population (ГК 26×Мо17). The improved technique of the electrophoretic analysis of products RAPD-PCR in polyacrylamide gel (system RAPD-PAAG) with optimal ratio: time of conduction — quality of distinction — cost of the methods is proposed. Methods will be used for express-analysis of F₂ population.

Key words: RAPD-analysis, polimorphism DNA, codomination, PAAG.